

UNIVERSITÉ DE GENÈVE

LABORATOIRE DE CHIMIE MINÉRALE, DE
CHIMIE ANALYTIQUE ET DE MICROCHIMIE

FACULTÉ DES SCIENCES

PROFESSEUR : P.-E. WENGER

Etude analytique de la phénylalanine nitrée

THÈSE

PRÉSENTÉE A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE GENÈVE
POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES CHIMIQUES

PAR

Roger GUERNE

de Genève (Suisse)

Ingénieur-chimiste diplômé de l'Université de Genève

Thèse N° 1263

NYON

IMPRIMERIE TH. MUHLETHALER S. A.

1957

UNIVERSITÉ DE GENÈVE

LABORATOIRE DE CHIMIE MINÉRALE, DE
CHIMIE ANALYTIQUE ET DE MICROCHIMIE

FACULTÉ DES SCIENCES

PROFESSEUR : P.-E. WENGER

Etude analytique de la phénylalanine nitrée

THÈSE

PRÉSENTÉE A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE GENÈVE
POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES CHIMIQUES

PAR

Roger GUERNE

de Genève (Suisse)

Ingénieur-chimiste diplômé de l'Université de Genève

Thèse N° 1263



NYON

IMPRIMERIE TH. MUHLETHALER S. A.

1957

La faculté des Sciences, sur le préavis de Monsieur le professeur D. MONNIER autorise l'impression de la présente thèse, sans exprimer d'opinion sur les propositions qui y sont énoncées.

Genève, le 3 novembre 1956

*Le doyen:
Fernand CHODAT*

Thèse n° 1263

Cette thèse a été faite dans les laboratoires de chimie analytique et de microchimie de Monsieur le professeur Paul-E. Wenger. Elle a été dirigée par Monsieur le professeur D. Monnier qui trouvera ici l'expression de ma reconnaissance pour ses conseils et son aide au cours de ce travail.

*A mes parents,
A ma femme.*

INTRODUCTION

La phénylalanine, sous sa forme lévogyre, est l'un des constituants les plus répandus des matières protéiques.

Elle peut être séparée des protéines, après hydrolyse acide et estérification, par distillation fractionnée et extraction à l'éther de l'ester éthylique. Par saponification, on obtient le chlorhydrate dont on libère la phénylalanine pure par neutralisation dans l'alcool.

La phénylalanine est peu soluble dans l'eau froide et dans l'alcool; elle est soluble dans l'eau chaude, d'où l'on peut la recristalliser sous forme d'aiguilles ou de feuillets, selon la concentration.

La l-phénylalanine fond à 275° - 280° , alors que la forme racémique fond à 320° .

Elle est précipitée de ses solutions aqueuses par le nitrate mercurique et par le réactif phosphotungstique; l'acide picrique la précipite comme picrate bien cristallisé.

La première méthode analytique employée pour la détermination de la phénylalanine est due à *Schulze-Kollman* (1) dont le procédé est basé sur l'oxydation de la phénylalanine par du bichromate de potassium en milieu sulfurique. L'acide benzoïque ainsi formé est extrait à l'éther, séché et pesé. Cette méthode, qui exige l'emploi d'une quantité importante de la substance à doser, donne des résultats trop faibles.

En 1930, *Brazier* (2) introduit une méthode de dosage d'une série d'amino-acides basée sur les différents degrés de solubilité des sels cuivriques des aminoacides dans des solvants tels que l'eau, le méthanol, l'éthanol.

Plus récemment, plusieurs méthodes chromatographiques ont été mises au point, principalement celle de *Martin* et *Synge* (3).

Kappeler et Adler (4) proposèrent une méthode colorimétrique par nitration de la phénylalanine et développement subséquent d'une coloration violette par addition d'hydroxylamine en milieu ammoniacal. Le mécanisme de cette réaction a été étudié en détail par *Block et Bolling* (5) qui apportèrent une modification à cette méthode. Le dosage colorimétrique, après nitration et réduction, s'effectue à 560 m μ . Par cette méthode, on arrive à doser de 0,5 à 2 mg. La précision n'est pas indiquée.

Hess et Sullivan en 1944 (6), dosent la phénylalanine dans un hydrolysât de protéines de la manière suivante: oxydation préalable par du permanganate pour détruire la tyrosine, puis nitration par un mélange nitrate de potassium et acide sulfurique concentré. Le produit de nitration est réduit par du zinc en poudre en milieu acide; une partie aliquote de cette dernière solution est additionnée de naphthoquinone sulfonate de sodium; la coloration produite est colorimétrée à 540 m μ .

Nous nous sommes proposés de mettre au point une méthode d'analyse de la phénylalanine rapide, précise et sensible.

Pour rester dans le cadre des travaux effectués dans nos laboratoires, dosages polarographiques de la tyrosine (7), tryptophane (8) et histidine (9), nous avons étudié un dosage polarographique de la phénylalanine.

Cet acide aminé n'étant pas réductible directement au polarographe, nous étudierons les possibilités de le nitrer pour obtenir un dérivé réactif.

On trouve dans la littérature plusieurs hypothèses non vérifiées sur les produits obtenus par l'action de l'acide nitrique sur la phénylalanine.

Notre but sera de ce fait double: dosage polarographique de la phénylalanine préalablement nitrée, et étude de la nitration de la phénylalanine.

CHAPITRE PREMIER

CONDITIONS DE NITRATION DE LA PHÉNYLALANINE

1. Concentration de l'acide nitrique

Nous avons opéré avec des acides de concentrations croissantes, sur des quantités de l'ordre de 10 mg de phénylalanine, en présence d'un large excès d'acide nitrique (environ 100 fois la quantité théorique).

Toutes les nitrations ont été effectuées à la température d'ébullition du mélange, par chauffage à reflux pendant une heure. Le produit de nitration est dilué, neutralisé par de la potasse caustique, en présence de rouge de méthyle, additionné de 10 ml. de solution tampon au phosphate de pH 7, amené au volume de 50 ml. et polarographié.

L'ion hydrogène intervenant dans la réduction des dérivés nitrés, nous travaillons toujours en présence de tampon. Nous utilisons le mélange acide citrique et phosphate disodique qui est valable pour une marge étendue de pH.

pH	ac. citrique 0,1 M	phosphate disodique 0,2 M
2,2	19,6 ml.	0,4 ml.
3	15,9	4,1
4	12,29	7,71
5	9,7	10,3
6	7,37	12,63
7	3,53	16,47
8	0,55	19,45

Les résultats obtenus sont portés au tableau I et graphique I; les concentrations de l'acide nitrique sont exprimées en normalité.

TABLEAU 1

Concentration HNO ₃	Concentration phénylalanine		i _d (va.)	K (i _d /c)
	g/l	mol/l		
3,3 N	pas de sauts, nitration nulle			
4,5 N				
6,7 N				
	0,12	0,73.10 ⁻³	3,3	4,5
	0,17	1,03	4,4	4,3
	0,22	1,30	6,6	5,0
8,3 N	0,23	1,39	15,0	10,8
	0,18	1,09	12,3	11,2
10 N	0,14	0,85	8,6	10,2
	0,28	1,70	19,7	11,6
	0,20	1,21	14,3	11,7
11,5 N	0,18	1,10	14,0	12,6
	0,28	1,70	22,7	13,2
	0,14	0,05	10,7	12,5
13,5 N	0,23	1,40	20,1	14,4
	0,18	1,09	16,4	15,0
H ₂ SO ₄ -KNO ₃	0,12	0,73	16,7	23,0
	0,18	1,09	26,9	25,0
	0,14	0,85	20,8	24,5

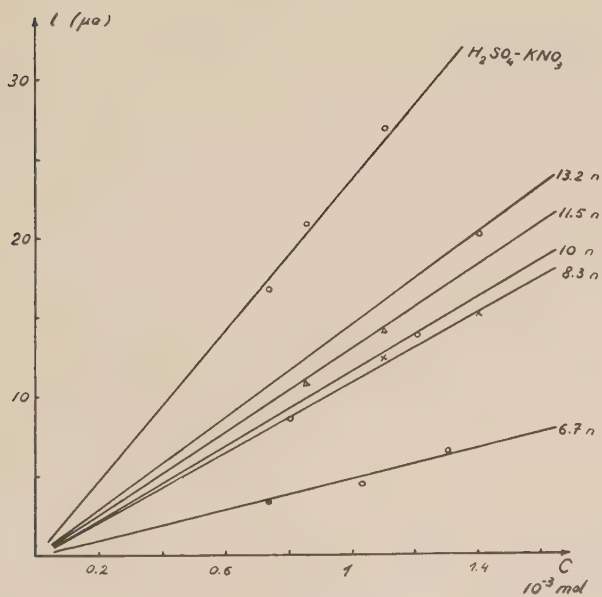
On remarque que la phénylalanine se nitre relativement difficilement et qu'avec de l'acide de concentration 4,5 N ou moins, il n'y a pas de réaction. Avec HNO₃ 6,7 N on obtient une nitration faible, et en augmentant la concentration on tend vers une limite. On voit qu'en opérant avec de l'acide 10 N, de petites variations de l'acidité auront une influence très faible sur les résultats; c'est la concentration que nous avons choisie pour établir notre courbe d'étalonnage.

En nitrant avec le mélange acide sulfurique concentré et nitrate de potassium, au bain marie à 100°, on obtient des valeurs beaucoup plus fortes; comme nous le verrons par la suite, on introduit dans ce cas un groupe nitro supplémentaire dans la molécule. Cette méthode serait avantageuse pour un microdosage, car la même quantité de phénylalanine produit un saut polarographique environ deux fois plus grand que lorsqu'elle est nitrée

par HNO_3 10 N. Malheureusement, les courbes obtenues sont moins nettes et plus difficiles à mesurer, ce qui diminue la précision.

Nous verrons dans la seconde partie de notre travail que par cette nitration plus énergique, on obtient plusieurs dérivés qui se réduisent simultanément à la cathode lors de la polarographie, les potentiels de réduction étant très proches; il se forme ainsi une seule vague combinée, légèrement irrégulière.

Nous étudierons principalement un dosage par nitration avec de l'acide nitrique 10 N et accessoirement avec le mélange $\text{H}_2\text{SO}_4\text{-KNO}_3$.



GRAPHIQUE 1

Nitration en fonction de la concentration de HNO_3

Appareillage

Nous avons utilisé tout au long de ce travail, le polarographe «Sargent XXI». Les mesures normales ont été effectuées au moyen de l'électrode à goutte de mercure, dont les caractéristiques étaient les suivantes :

Hauteur de la colonne de mercure: 25 cm.

Temps de chute d'une goutte: 4,6 sec.

Masse de mercure: 1,92 mg./sec. (en circuit ouvert)

Les mesures polarographiques sont effectuées à une température moyenne de 18° C.

Les potentiels de demi-sauts ($E_{1/2}$) sont mesurés par rapport à la surface de mercure prise comme anode, et sont tous de signe négatif.

2. Durée de nitration

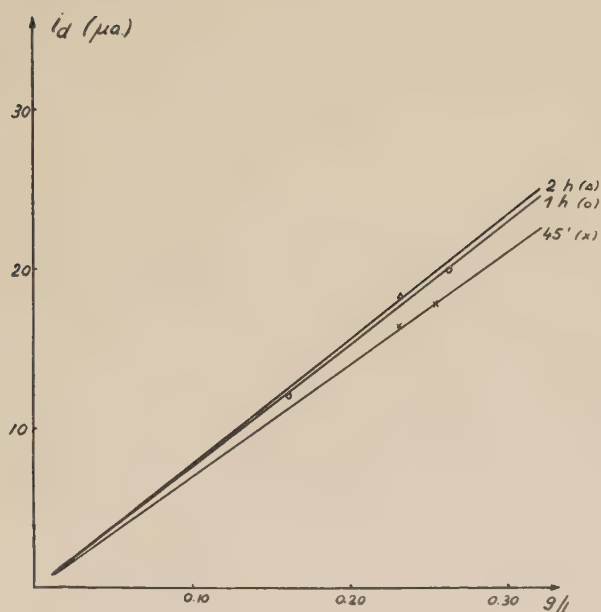
Pour étudier l'influence du temps sur la réaction, nous avons nitré à reflux, à la température d'ébullition, avec de l'acide 10 N en faisant varier la durée de l'opération.

Après neutralisation, addition de tampon et dilution à 50 ml., nous avons obtenu les résultats suivants à l'analyse polarographique :

TABLEAU 2

Nitrations à temps croissants

Conc. phénylalanine gr/l		mol/l	durée nitration	i _d	K
0,26		1,57.10 ⁻³	1 heure	20,50	13.10 ⁻³
0,16		0,97	1 "	12,30	12,7
0,23		1,39	2 "	18,60	13,4
0,38		2,30	2 "	26,60	11,7
0,23		1,39	45 min.	16,90	12,2
0,25		1,52	45 "	18,00	11,9



GRAPHIQUE 2

Nitration en fonction de la durée de réaction

L'influence de la durée de réaction, entre 45 minutes et 2 heures, est peu marquée, surtout entre 1 h. et 2 h. Nous avons choisi un temps de chauffage de 1 h. 30 min. pour avoir une nitration constante; de petites variations dans le temps ne causent pas d'erreurs appréciables.

CHAPITRE II

CONDITIONS DE POLAROGRAPHIE DE LA PHÉNYLALANINE NITRÉE

Etude en fonction du pH

Nous avons opéré la nitration dans les conditions choisies (1 h. 30 min. à ébullition à reflux avec de l'acide nitrique 10 N) d'une quantité de phénylalanine plus importante, neutralisé la solution obtenue et dilué à un volume donné (43,6 mg. de phénylalanine pour un volume final de 100 ml.)

Sur des parties aliquotes de 10 ml. additionnées de solution tampon, portées à 50 ml. et dont le pH est vérifié au pH-mètre à électrode de verre Beckmann modèle H-2, on effectue la polarographie après avoir chassé l'oxygène dissout, par un courant d'hydrogène purifié, durant 10 minutes.

Nous avons d'abord travaillé avec l'électrode à goutte de mercure et anode de mercure. Puis nous avons procédé à une autre série de mesures en effectuant la polarographie avec une électrode de référence au calomel afin d'avoir des valeurs de potentiel bien déterminées. En effet, dans le système cathode à goutte-solution-anode de mercure, le potentiel anodique est fonction des ions en solution, ce qui fausse le potentiel $E_{1,2}$ que l'on mesure. En employant une électrode de référence, le pH n'influe plus sur le potentiel de l'anode, car nous avons: cathode à goutte-solution-pont de KCl saturé anode (électrode de référence au calomel).

De pH 3 à pH 12, on obtient un saut unique, bien dessiné et de hauteur constante. Les valeurs de $E_{1,2}$ observées sont très proches de celles données par Page et Smith pour l'acide p-nitrobenzoïque (11).

Le pH a un effet marqué sur les valeurs de $E_{1/2}$, mais peu d'influence sur le courant de diffusion. Donc en travaillant en milieu tamponné, de petites variations de pH n'auront pratiquement pas d'influence lors du dosage par cette méthode.

TABLEAU 3

Etude en fonction du pH.

Concentration en phénylalanine : $0,62 \cdot 10^{-3}$ mol.

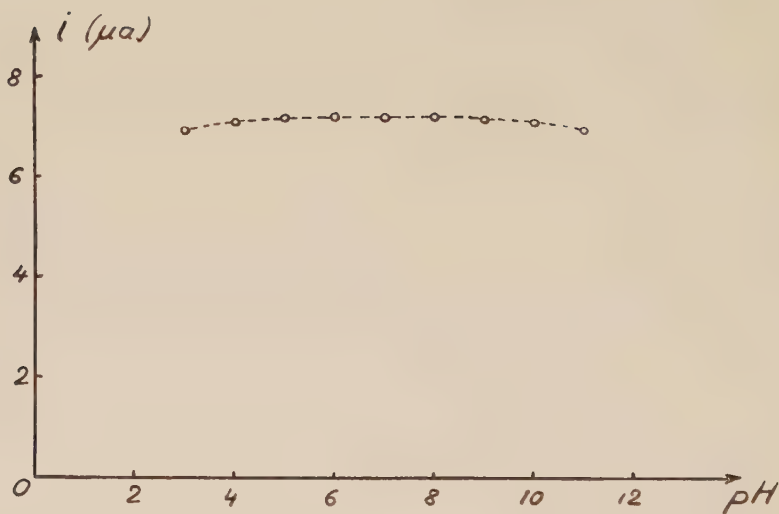
pH	i (μ a.)	$E_{1/2}$ (v.)
3	6,95	0,55
4	7,15	0,61
5	7,25	0,615
6	7,25	0,63
7	7,25	0,65
8	7,25	0,72
9	7,20	0,70
10	7,10	0,67
11	6,95	0,67

TABLEAU 4

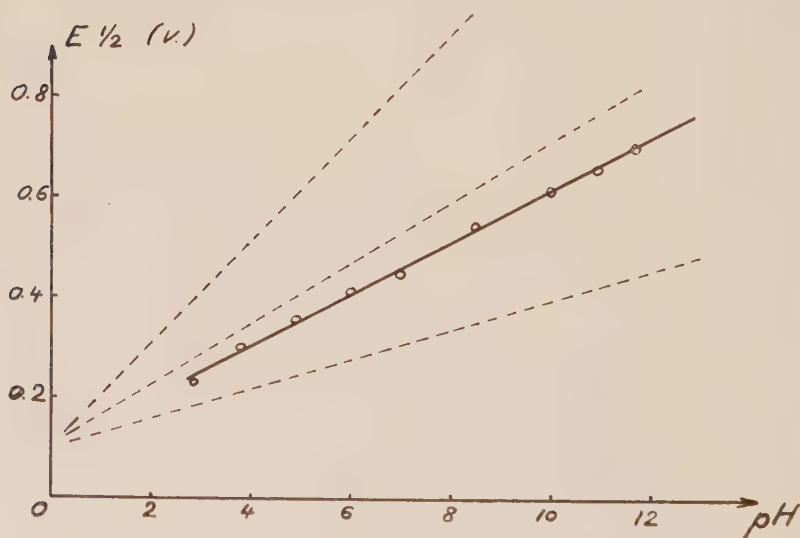
Etude en fonction du pH, avec électrode de référence au calomel.

pH	i (μ a.)	$E_{1/2}$ (v.)	$\Delta E_{1/2} / \Delta \text{pH}$
2,8	6,3	0,235	0,070
3,8	6,2	0,305	0,050
4,9	6,2	0,360	0,054
6,0	6,4	0,420	0,030
7,0	6,2	0,450	0,066
8,5	6,15	0,550	0,047
10,0	6,1	0,620	0,045
10,9	6,15	0,660	0,050
11,7	6,1	0,700	

Les graphiques 3 et 4 correspondent respectivement aux tableaux 3 et 4 ci-dessus.



GRAPHIQUE 3
Variation du courant de diffusion en fonction du pH



GRAPHIQUE 4
Variation des $E_{1/2}$ en fonction du pH

CHAPITRE III

ÉTUDE DES RÉSULTATS POLAROGRAPHIQUES DE LA PHÉNYLALANINE NITRÉE PAR HNO_3 ION

I. Etude logarithmique des polarogrammes.

Nous étudierons plusieurs courbes à divers pH, Le potentiel en un point quelconque est donné par l'équation :

$$E = E_{1/2} - \frac{0,059}{n} \log \frac{i}{i_d - i}$$

E = potentiel en volts

$E_{1/2}$ = potentiel du demi-saut exprimé en volts

i = intensité du courant au potentiel E ,

i_d = courant de diffusion maximum.

Les valeurs calculées sont données dans le tableau 5.

TABLEAU 5

Concentration phénylalanine	pH	Point	i (μa)	E (v.)	i_d	$\log \frac{i}{i_d - i}$	n
$0,9 \cdot 10^{-3}$ mol.	4	A	1,28	0,248	10,25	$\overline{1},153$	0,96
		B	2,88	0,272	"	$\overline{1},590$	0,85
		C	5,10	0,300	"	0	
		D	6,95	0,325	"	0,320	0,75
		E	9,30	0,360	"	0,990	0,99
$0,75 \cdot 10^{-3}$ mol.	6	A	1,20	0,335	8,95	$\overline{1},152$	1,06
		B	2,88	0,365	"	$\overline{1},670$	1,12
		C	4,40	0,382	"	0	
		D	6,10	0,410	"	0,330	0,70
		E	7,65	0,440	"	0,770	0,78
$0,88 \cdot 10^{-3}$ mol.	8	A	1,60	0,448	10,40	$\overline{1},260$	1,04
		B	3,36	0,472	"	$\overline{1},680$	1,06
		C	5,05	0,490	"	0	
		D	7,35	0,520	"	0,390	0,78
		E	9,75	0,554	"	1,180	0,90

La valeur de « n » varie entre 0,70 et 1,12. Comme nous le verrons par la suite, le nombre d'électrons échangés est de 4 et ne correspond pas à cette valeur de « n ». Ce fait nous confirme que la réaction est irréversible.

II. Etude des potentiels $E_{1/2}$ en fonction du pH.

En combinant l'équation générale d'oxydo-réduction faisant intervenir l'hydrogène :



avec celle de l'équation donnant le potentiel d'oxydo-réduction, nous avons :

$$E_{1/2} = E_0 - \frac{0,059}{n} \log \frac{k_{\text{ox}}}{k_{\text{red}}} + 0,059 \frac{m}{n} \log [\text{H}^+]$$

Le rapport $\frac{k_{\text{ox}}}{k_{\text{red}}}$ étant approximativement 1, l'équation peut être simplifiée :

$$E_{1/2} = E_0 - 0,06 \frac{m}{n} \text{ pH}$$

En reprenant le graphique 4 où sont portées les valeurs $E_{1/2}$, nous trouvons par extrapolation la valeur $E_0 = 0,1$ volt. A partir de cette valeur, nous pouvons calculer les variations théoriques de $E_{1/2}$ en fonction du pH. En prenant pour le rapport $\frac{m}{n}$ les valeurs 0,5, 1, 2, nous trouvons :

$\frac{m}{n}$	pH	1	2	3	4	5	6	7	8	9
0,5	$E_{1/2}$	0,13	0,16	0,19	0,22	0,25	0,28	0,31	0,34	0,37
1		0,16	0,22	0,28	0,34	0,40	0,46	0,52	0,58	0,64
2		0,22	0,34	0,46	0,58	0,70	0,82	0,94	1,06	1,18

Ces valeurs sont portées sur le graphique 4. Pour la valeur $\frac{m}{n} = 1$ nous obtenons une droite de pente légèrement plus forte que la droite des valeurs expérimentales; pour les deux autres rapports, les droites diffèrent nettement des précédentes.

On peut donc admettre que le rapport $\frac{m}{n}$ est égal à 1, c'est-à-dire que dans la réduction il intervient un hydrogène par électron.

III. Calcul du nombre d'électrons « n ».

Nous avons déterminé « n » en appliquant la formule de *Ilkovic* :

$$n = \frac{i_d}{605 \cdot c \cdot D^{1/2} \cdot m^{2/3} \cdot t^{1/6}}$$

i_d = courant de diffusion en μa

c = concentration en millimol/litre

D = constante de diffusion en cm^2/sec^{-1}

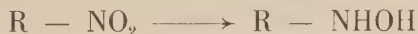
m = masse de mercure en mg/sec

t = temps de gouttes en sec.

La constante de diffusion D n'est pas connue pour la phényl-analine nitrée et sa détermination, par des mesures de conductibilité, présente des difficultés, d'autant plus qu'on ne dispose pas de la substance à l'état pur. Nous avons attribué au corps étudié une constante connue d'un corps de structure semblable, celle de l'acide o-nitrobenzoïque. La constante de diffusion de ce corps est donnée par *Page-Smith-Waller* (11) : $D = 6,0 \cdot 10^{-6} cm^2/sec$.

Nous appliquons l'équation de *Ilkovic* en prenant pour la concentration 10^{-3} mol et le courant de diffusion correspondant $i_d = 11,8 \mu a$ (voir courbe d'étalonnage page 18). Les valeurs pour « m » et « t » ont été données en page 9. Nous trouvons $n = 4,1$.

Ce calcul nous montre que nous sommes en présence d'une réduction polarographique normale : le groupe nitro aboutissant au stade hydroxylamine, comme dans la généralité des cas à ces pH.



Dennis-Powell-Astle (10) ont également effectué la polarographie de l'acide o-nitrobenzoïque et ont trouvé pour ce corps une constante $D = 8,28 \cdot 10^{-6}$; en prenant cette valeur, nous trouvons $n = 3,4$. La température pour laquelle les constantes sont valables n'étant pas indiquée, il est possible qu'elles aient été calculées à des températures différentes.

CHAPITRE IV

DOSAGE POLAROGRAPHIQUE DE LA PHÉNYLALANINE NITRÉE

Les prises de phénylalanine de 1 à 10 mg sont pesées directement dans le tube. Pour les quantités inférieures, nous avons préparé une solution aqueuse de phénylalanine (0,1 g/l), des quantités de 0,5 à 5 ml. sont mesurées exactement et placées dans le tube. Après évaporation à l'étuve à 90°C., on a des prises de 50 γ à 0,5 mg du corps étudié.

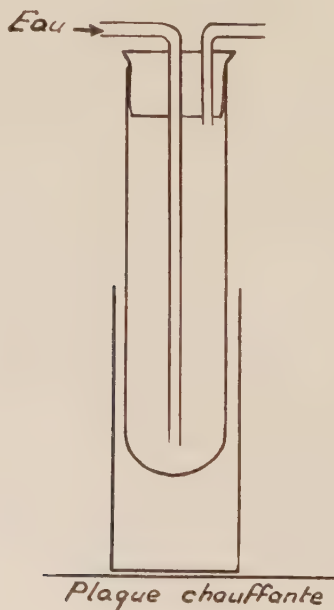


fig. 1

Les nitrations sont effectuées dans des tubes de verre à fond plat, de 10 cm de long et 2 cm de diamètre. On ajoute pour chaque essai 0,5 ml. de HNO_3 10 N et l'on porte à ébullition pendant 1 h. 30 min. par chauffage sur une plaque électrique. Le reflux est assuré par une éprouvette dans laquelle on fait circuler de l'eau froide, de diamètre légèrement inférieur à celui du tube, et arrivant à mi-hauteur de celui-ci. (fig. 1)

La nitration terminée, on laisse refroidir puis on neutralise avec une solution de potasse caustique normale, en présence de deux gouttes de rouge de méthyle. Cet indicateur que nous utilisons pour la neutralisation intervient dans le dosage polarographique comme supprimeur de maxima. On porte le volume à 10 ml., dans un ballon jaugé, en complétant avec environ 5 ml. de solution tampon pH 6 (phosphate disodique-acide citrique). On chasse l'oxygène de la solution par un courant d'hydrogène durant 10 minutes et effectue la polarographie dans les conditions décrites précédemment. Les résultats obtenus sont reportés dans le tableau 6 et le graphique 6.

TABLEAU 6
Courbe d'étalonnage

Prise (mg)	Concentration effective (mol/l)	i (μa)	$E_{1/2}$	Concentration trouvée	Erreur
0,05	$3,03 \cdot 10^{-5}$	0,48	0,60	$3,25 \cdot 10^{-5}$	+ 6 ^o / ₀
0,10	6,06	0,96	0,58	6,78	+ 12
0,20	$1,21 \cdot 10^{-4}$	1,55	0,60	$1,25 \cdot 10^{-4}$	+ 3,3
0,30	1,82	2,28	0,58	1,88	+ 3,4
0,40	2,42	2,96	0,58	2,47	+ 2
0,50	3,03	3,68	0,59	3,08	+ 1,6
0,78	5,20	6,30	0,58	5,30	+ 2
1,00	6,06	7,12	0,58	6,21	+ 2,4
1,29	7,80	9,35	0,59	7,97	+ 2,2
1,65	$1,00 \cdot 10^{-8}$	11,85	0,60	$1,04 \cdot 10^{-8}$	+ 0,4
1,65	1,00	11,45	0,59	0,97	— 3
2,11	1,28	14,70	0,58	1,25	— 2,5
3,00	1,82	20,80	0,60	1,80	— 1
5,00	3,03	36,80	0,59	3,06	+ 1
10,00	6,06	72,00	0,59	6,03	— 0,5

Nous avons tracé la droite passant par la moyenne de ces mesures, chaque point correspond à une nitruration différente. Cette droite moyenne constitue la courbe d'étalonnage. Nous avons comparé les concentrations trouvées d'après cette moyenne avec les concentrations effectives et calculé l'erreur commise pour chaque mesure.

Nous voyons que le dosage est réalisable pour des concentrations comprises entre $2,4 \cdot 10^{-4}$ et $6 \cdot 10^{-3}$ molaire, avec une erreur inférieure à 2,5 %. Pour des concentrations plus fortes, les résultats ne s'alignent plus sur une droite et deviennent trop faibles. La quantité minimum dosable est de l'ordre de 30 γ dans 10 cc, soit $2 \cdot 10^{-5}$ molaire. L'erreur maximum est alors plus considérable et atteint 12 %.

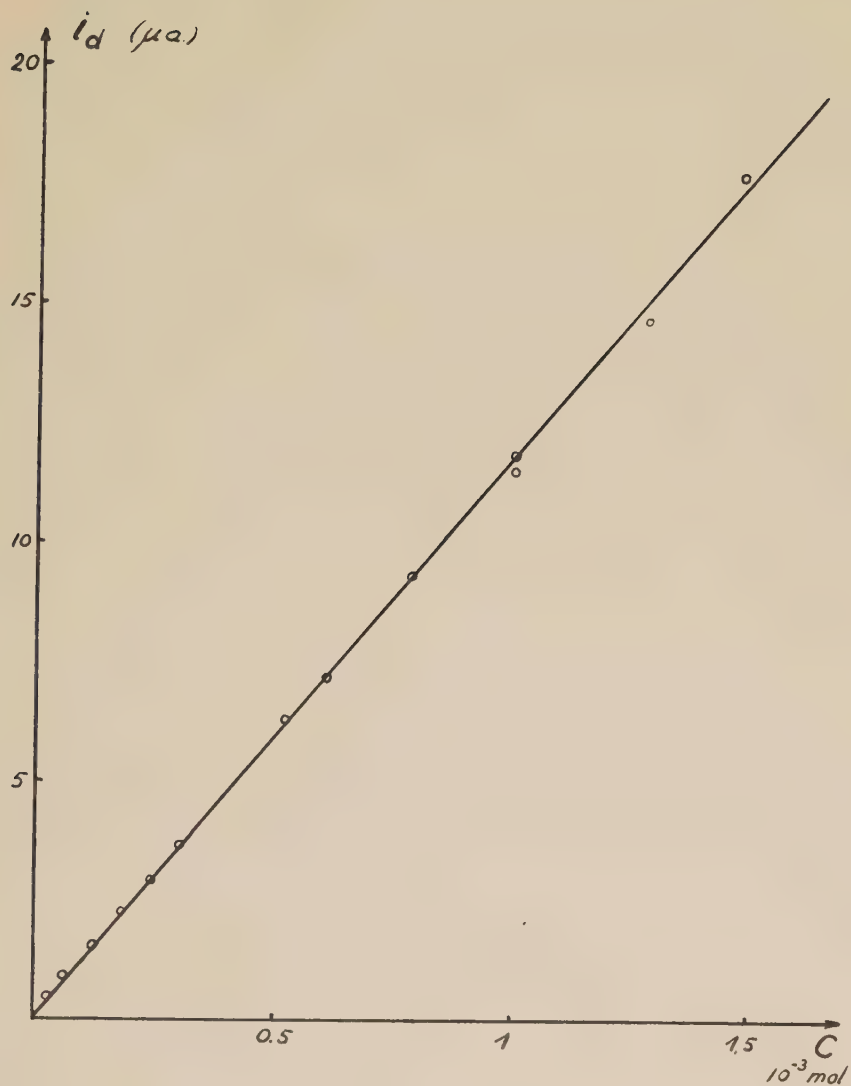
Nous proposons à la page 24 une méthode de dosage par étalon interne qui rend le dosage indépendant des constantes de l'appareil et supprime l'emploi de la courbe d'étalonnage.

Remarque sur la stabilité des solutions.

Nous avons observé la stabilité d'une solution de phénylalanine nitrée dans les conditions du dosage, tamponnée à pH 6. Nous avons préparé une solution selon le mode opératoire décrit et effectué immédiatement une analyse polarographique sur une partie de cette solution. Les polarogrammes obtenus après 2, 6, 12 et 24 heures ne présentent aucune évolution et sont parfaitement reproductibles.

Microdosage.

Nous n'avons pas étudié de méthode micro; mais il serait possible d'effectuer le dosage de quantités plus faibles en tenant compte des difficultés dues à la concentration élevée en sels. Pour assurer la nitruration par ébullition à reflux, il faut en effet un volume minimum d'acide nitrique 10 N qui donne une concentration élevée en nitrate de potassium lors de la neutralisation. Pour le dosage de très petites quantités de phénylalanine, il faudrait éliminer une partie des sels inorganiques par désalification.



GRAPHIQUE 6

Courbe d'étalonnage de la phénylalanine nitrée

CHAPITRE V

ÉTUDE COMPARATIVE DE DÉRIVÉS VOISINS MONONITRÉS

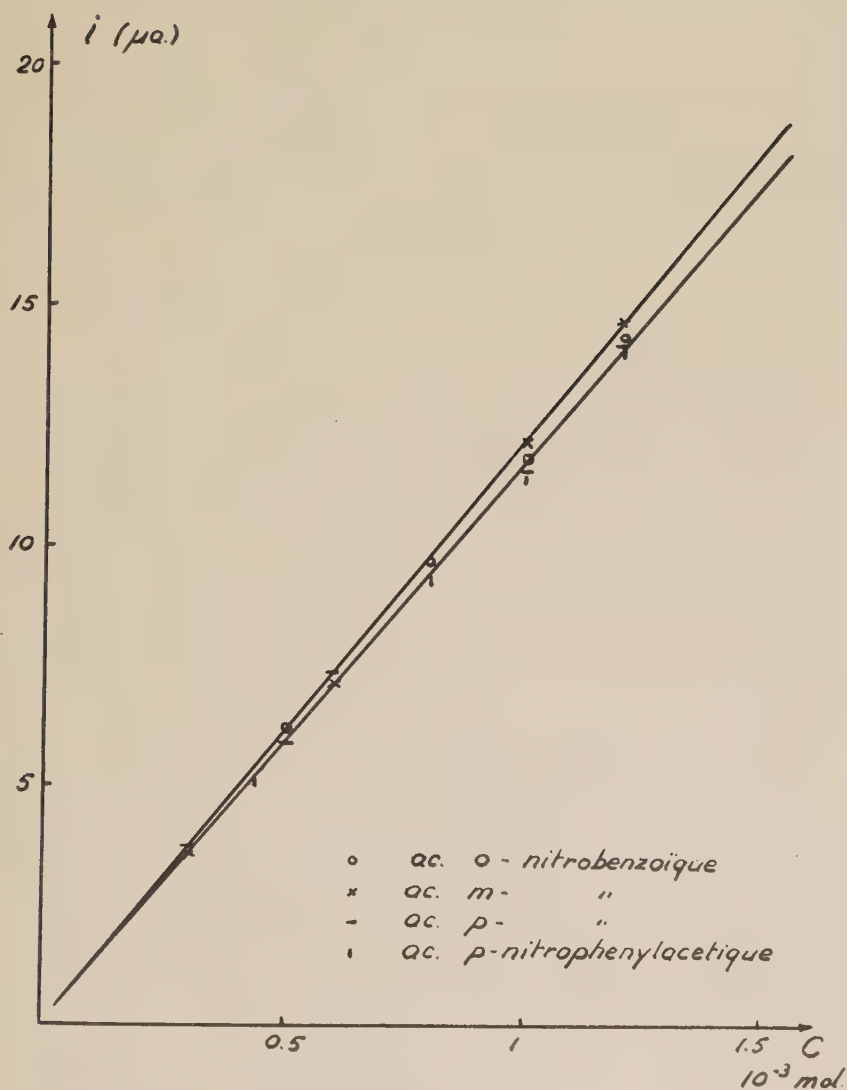
Les trois isomères de l'acide nitrobenzoïque ont été étudiés polarographiquement par *Page-Smith* (10). Nous avons examiné leur comportement dans les conditions de notre méthode de dosage, et étudié l'acide p nitrophénylacétique, de constitution très proche de la nitrophénylalanine et qui n'a pas encore fait l'objet d'une étude polarographique.

Préparation des solutions

Nous avons préparé une solution de ces différents acides à 0,5 % dans l'alcool. Des quantités croissantes sont mesurées à l'aide d'une burette et diluées avec de l'eau distillée dans un ballon jaugé de 50 ml.; on ajoute pour chaque essai, 5 ml. de solution tampon pH 6 (phosphate disodique-acide citrique) et 5 ml de KNO_3 molaire. Nous avons ainsi des conditions identiques à celles du dosage de la phénylalanine nitrée, mis à part une faible proportion d'alcool (1 à 3 %).

TABLEAU 7
Courbes d'étalonnage de dérivés voisins

Concentration mol.	i (μa)			
	acide p- nitrophénylacétique	acides nitrobenzoïques		
		o -	m -	p -
$0,3 \cdot 10^{-3}$				
0,44				
0,5	5,1	6,2	3,6	3,7
0,6				
0,8	9,3	9,7	7,2	5,9
1,0	11,4	11,9		7,5
1,2	14,2	14,4	12,2	
			14,8	11,6
				14,3



GRAPHIQUE 6

Courbe d'étalonnage de dérivés mononitrés

Les courbes d'étalonnage de l'acide p-nitrobenzoïque et p-nitrophénylacétique sont pratiquement superposables à celle de la

phénylalanine nitrée, celles des deux autres acides étant de pente légèrement plus forte.

Nous avons essayé d'introduire dans une solution de phénylalanine nitrée une certaine quantité d'acide p-nitrobenzoïque. Le polarogramme de ce mélange nous montre une augmentation du saut, proportionnelle à la quantité ajoutée; l'allure de la courbe n'est absolument pas modifiée, le saut se présentant toujours comme une vague unique, très bien dessinée.

Méthode de dosage par étalon interne de la phénylalanine

Cette méthode supprime l'inconvénient d'avoir recours à une courbe d'étalonnage, variable selon l'appareillage utilisé et qui nécessite l'emploi de substance à l'état pur. On utilise dans ce cas l'acide p-nitrobenzoïque dont le comportement polarographique est identique à celui de la phénylalanine nitrée. Nous opérons alors de la manière suivante:

Après nitration et dilution comme pour le dosage normal déjà cité, nous partageons la solution en deux parties égales; la première est polarographiée directement. La seconde partie est additionnée d'une quantité connue d'acide p-nitrobenzoïque et polarographiée.

Un simple calcul du rapport de deux sauts nous donne la concentration de phénylalanine.

Avec la solution de phénylalanine nitrée de concentration inconnue C_x , nous obtenons un saut de hauteur H_x . Avec la solution contenant la phénylalanine nitrée à la même concentration inconnue plus une quantité déterminée d'acide p-nitrobenzoïque, de concentration C_l connue nous obtenons un saut de hauteur H_l .

$$C_x = C_l \cdot \frac{H_x}{H_l - H_x}$$

$H_l - H_x$ hauteur correspondant à la concentration C_l connue.

Etude en fonction du pH

Nous avons appliqué le même mode opératoire que lors de l'étalonnage (p. 22). La solution des divers acides à 0,5 % dans l'alcool

est additionnée de solution tampon de pH voulu et de nitrate de potassium. Après dilution dans un ballon jaugé, le pH est mesuré au pH- mètre Beckmann. La concentration constante est $c = 0,6 \cdot 10^{-3}$ mol.

La polarographie est effectuée avec la cathode à goutte et une électrode de référence au calomel.

pH	$E_{1/2}$ (volt)		
	acides nitrobenzoïques		ac. p-nitrophénylacétique
	p.-	m.-	
2,3	0,17	0,18	0,18
4,0	0,28	0,29	0,30
5,8	0,39	0,41	0,42
8,0	0,53 }	0,64	0,59
	0,83 }		
10,5	0,70	0,70	0,72

Les valeurs obtenues sont très proches de celles données par *Page-Smith*. Par contre nous n'avons observé deux sauts que pour l'acide p-nitrobenzoïque au pH 8, alors que ces auteurs signalent une double vague pour les acides p- et m-nitrobenzoïques de pH 8 à pH 12.

Nous voyons qu'aux mêmes pH les potentiels $E_{1/2}$ de ces trois corps sont très voisins des valeurs obtenues avec la phénylalanine nitrée. Ceci nous explique que l'adjonction de l'un ou l'autre de ces acides à une solution de phénylalanine nitrée ne modifie pas l'allure du saut, les deux composants se réduisant au même potentiel, leurs sauts respectifs s'ajoutent simplement.

CHAPITRE V

ÉTUDE POLAROGRAPHIQUE DE LA PHÉNYLALANINE NITRÉE PAR $\text{H}_2\text{SO}_4\text{-KNO}_3$

Etude en fonction du pH

Nous avons nitré 33 mg. de phénylalanine par un mélange de 1 ml. d'acide sulfurique concentré et 0,2 g de nitrate de potassium, par chauffage sur un bain-marie à ébullition durant 1 heure. Après neutralisation par de la potasse caustique, le volume est porté à 100 ml. Des parties aliquotes de 10 cc sont additionnées de solution tampon de pH voulu, de trois gouttes de rouge de méthyle et diluées à 100 ml.

Concentration : 33 g/l phénylalanine, soit $2 \cdot 10^{-4}$ mol.

pH	i (μa)	$E_{1/2}$ moyen (v.)	
3,0	4,35	0,17	1 vague
4,5	4,50	0,26	
5,2	4,15	0,31	2 vagues
6,5	4,20	0,31	
7,4	4,40	0,40	
8,9	4,50	0,49	3 vagues
10,5	4,10	0,54	
11,5	4,20	0,60	

Les polarogrammes dès le pH 4,5 sont constitués par deux et même trois vagues; on est cependant obligé de mesurer l'ensemble du saut car les vagues ne sont pas séparées par des paliers nettement dessinés, mais seulement marquées par des inflexions de la courbe.

Courbe d'étalonnage de la phénylamine nitrée par $H_2SO_4-KNO_3$

Nous avons opéré sur des quantités de 0,5 à 10 mg de phénylalanine; nous ajoutons pour chaque essai 1 ml. d'acide sulfurique concentré et 0,2 g de nitrate de potassium et chauffons au bain-marie à ébullition pendant une heure. Après dilution, nous neutralisons avec de la potasse caustique normale, ajoutons 10 ml. de solution tampon pH 6 et portons le volume à 50 ml.

La polarographie s'effectue dans les mêmes conditions que précédemment.

TABLEAU 8

Courbe d'étalonnage pour la nitration par $H_2SO_4-KNO_3$

Prise mg.	Concentration réelle		i (μa)	Conc. trouvée mol/l	Erreur
	g/l	mol/l			
0,50	0,010	$0,61 \cdot 10^{-4}$	1,60	$0,60 \cdot 10^{-4}$	— 1,7%
1,00	0,020	1,21	3,30	1,25	+ 3
1,70	0,034	2,06	4,75	1,90	— 8
2,75	0,055	3,34	8,50	3,40	+ 1,8
3,00	0,060	3,63	8,80	3,55	— 2,1
5,00	0,100	6,06	15,00	6,10	+ 0,8
5,50	0,110	6,70	16,60	6,70	0
10,00	0,200	$1,21 \cdot 10^{-3}$	29,80	1,22	+ 0,8

Ces résultats sont reportés sur le graphique 8.

Cette seconde méthode permet de doser de 0,5 à 10 mg de phénylalanine avec une précision d'environ 3%. Il n'est pas possible de travailler avec des concentrations plus faibles sans avoir recours à une désalification partielle, car l'acide sulfurique concentré employé pour la nitration forme une grande quantité de sels lors de la neutralisation. La dilution finale doit alors être suffisante pour que la concentration en sulfate de potassium ne fausse pas la polarographie de la phénylalanine nitrée; c'est pourquoi le volume final est porté à 50 ml. Les sauts ne sont plus mesurables aux concentrations inférieures à $0,6 \cdot 10^{-4}$ mol en phénylalanine.

CHAPITRE VII

ÉTUDE COMPARATIVE DE DÉRIVÉS VOISINS DINITRÉS

Nous avons établi les courbes d'étalonnage des acides 2-4 et 3-4 dinitrobenzoïques et de l'acide 2-4-6 trinitrobenzoïque. Ces corps ont été mis en solution à 1 % dans l'alcool. Des quantités croissantes sont introduites dans un ballon jaugé de 50 ml., avec 5 cc de solution tampon pH 6 et de 10 ml. de sulfate de potassium molaire. On ajoute également 2-3 gouttes de rouge de méthyle (supprimeur de maxima) et l'on complète au volume avec de l'eau distillée.

Concentration mol.	i (μ a)		
	acides dinitrobenzoïques 2—4	3—5	ac. trinitrobenzoïque 2—4—6
0,195 10^{-3}			7,8
0,235 "	6,0	5,3	
0,39 "			14,7
0,47 "	11,5	11,8	
0,78 "			30,2
0,94 "	22,3	21,8	
1,17 "			43,5
1,41 "	32,9	33,4	

Ces résultats sont portés sur le graphique 7.

Le dosage polarographique de ces acides est possible par cette méthode, pour des concentrations comprises entre 0,2 et $1,4 \cdot 10^{-3}$ mol., avec une erreur maxima de 7 %.

Les courbes d'étalonnage des acides 2-4 et 3-5 dinitrobenzoïques sont superposées et de pente légèrement plus faible que la courbe obtenue pour la phénylalanine nitrée par $\text{H}_2\text{SO}_4\text{-KNO}_3$.

Nous remarquons que pour les mêmes concentrations, exprimées en moles, le courant de diffusion des acides dinitrobenzoïques est le double de la valeur obtenue avec des acides mononitrobenzoïques. Cela signifie que les deux groupes se réduisent au stade hydroxylamine, avec un échange de 8 électrons au total.

Nous n'avons pas étudié systématiquement les trois acides ci-dessus en fonction du pH, mais simplement remarqué que les acides dinitrobenzoïques donnent une vague polarographique en milieu acide et deux en milieu basique. Nous avons vu que la phénylalanine nitrée par le mélange $\text{H}_2\text{SO}_4\text{-KNO}_3$ donne un saut en milieu acide et trois nettement marqué en milieu alcalin, avec encore deux inflexions très légères; ainsi cette nitration de la phénylalanine fournit plusieurs dérivés qui se réduisent simultanément au polarographe. Les potentiels de réduction des divers dérivés nitrés sont très voisins, et leurs sauts s'ajoutent, sans se différencier nettement, marqués seulement par des inflexions dans la courbe.

Ces constatations seront d'ailleurs confirmées plus loin, grâce à l'analyse chromatographique des produits obtenus par nitration.

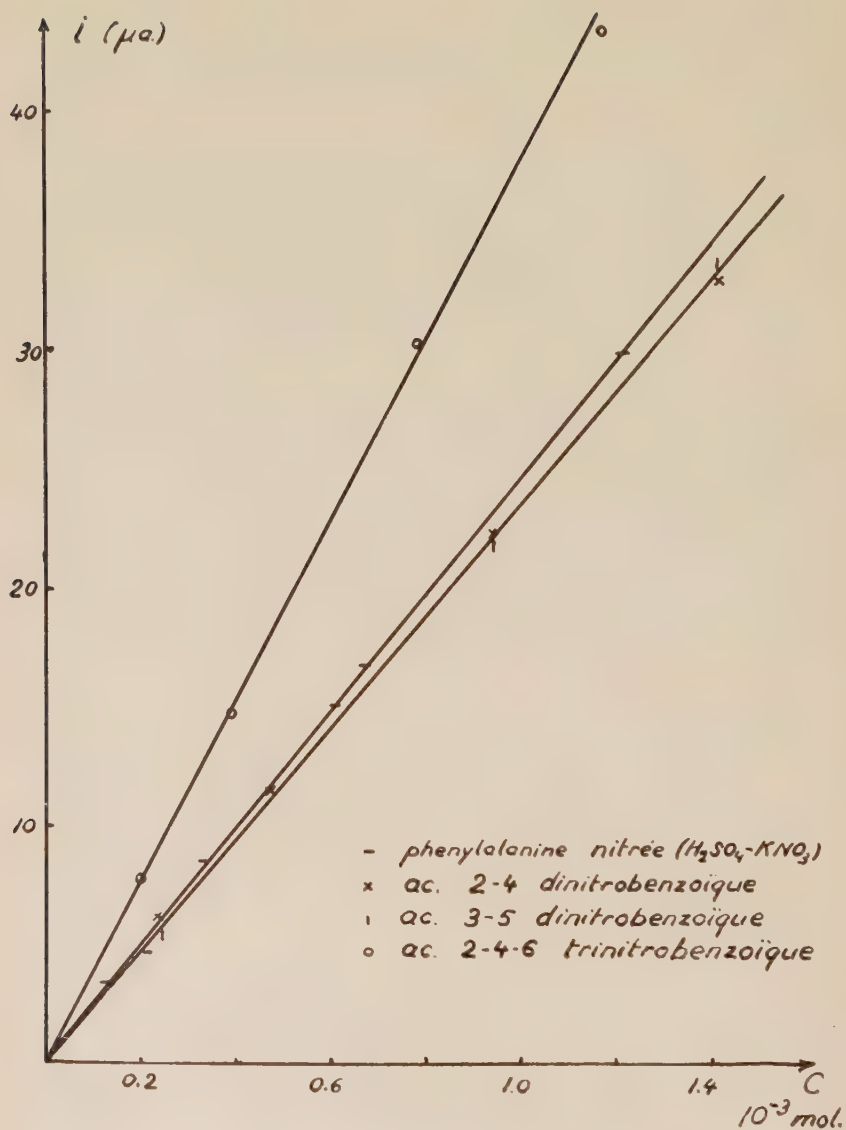
La courbe d'étalonnage de la phénylalanine nitrée par $\text{H}_2\text{SO}_4\text{-KNO}_3$ étant de pente sensiblement égale à celle des acides dinitrobenzoïque, nous pouvons déjà supposer que par cette nitration on obtient un mélange de dinitro dérivés pratiquement exempt de mono et trinitro.

En appliquant la formule de *Ilkovic* aux résultats obtenus avec ces divers dérivés et en employant arbitrairement la constante D de l'acide p-nitrobenzoïque (voir page 17) on trouve :

$n = 8$ pour les acides 2-4, 3-5 dinitrobenzoïques et pour la phénylalanine nitrée par $\text{H}_2\text{SO}_4\text{-KNO}_3$.

$n = 12$ pour l'acide trinitrobenzoïque.

Cela signifie que ces corps se réduisent avec 8 et 12 électrons pour aboutir respectivement aux stades di et trihydroxylamine.



GRAPHIQUE 7

Courbes d'étalonnage de dérivés dinitrés

Au pH 6, dans les conditions du dosage, les courbes obtenues avec les acides dinitrobenzoïques sont très semblables à celles obtenues avec la phénylalanine nitrée par le mélange nitrate-acide sulfurique. Les potentiels $E_{1/2}$ étant très voisins, l'adjonction de l'un des acides dinitrobenzoïques dans la solution de phénylalanine nitrée produit un accroissement du saut polarographique sans en modifier la forme. Il serait également possible d'établir une méthode par étalon interne, en employant de l'acide dinitrobenzoïque à la place de dinitrophénylalanine difficilement obtenue à l'état pur.

Réduction des dérivés nitrés au polarographe.

Pearson (13, 14) a étudié systématiquement le comportement polarographique des nitrobenzènes, nitrotoluènes, nitrophénols et nitrorésorcinols. La réduction des hydrocarbures nitrés s'effectue en milieu neutre et alcalin avec 4 électrons, jusqu'au stade hydroxylamine et en milieu acide (pH 2,5) avec 6 électrons jusqu'au stade amine. Le m-dinitrobenzène produit 2 sauts en mettant en jeu 8 électrons en milieu neutre et alcalin; en milieu acide, on observe 3 sauts correspondant à 12 électrons. Les deux autres isomères présentent des stades intermédiaires en milieu neutre; un groupe nitro se réduit en amine, l'autre en hydroxylamine, avec un total de 10 e. Le second groupe nitro influe sur le premier et augmente son potentiel de réduction. Cet effet est principalement marqué pour les groupes placés en position o- et p- l'un par rapport à l'autre.

Le m-nitrophénol se réduit jusqu'au stade hydroxylamine avec 4 e, sauf en milieu très acide (6 e). Les deux autres isomères se réduisent jusqu'au stade amine, avec 6 e. Les dinitrophénols se réduisent à presque tous les pH avec 10 e, un groupe NO_2 aboutissant à NHOH , l'autre à NH_2 . Dans le cas des phénols, le groupe hydroxyle fixé sur le noyau donne une forme quinoïde facilement réductible.

Page-Smith-Waller (11) ont examiné toute une série de dérivés nitrés, entre autres les trois acides mono-nitrobenzoïques. Ces auteurs ont travaillé dans des conditions légèrement différentes

des nôtres : en milieu tamponné et en présence de 10 % d'alcool. Ils obtiennent une vague en milieu neutre, deux en milieu acide et alcalin. La hauteur totale des sauts correspond à 4 e en travaillant au-dessus de pH 4, et à 6 e au dessous de pH 4.

Dennis, Astle, Powell (10) ont effectué la polarographie des acides nitrobenzoïques en milieu tamponné, mais sans adjonction d'alcool. Il obtiennent des sauts avec une seule vague, sauf pour le dérivé m- qui donne deux vagues en milieu alcalin. La réduction s'opère uniformément avec 4 e à tous les pH.

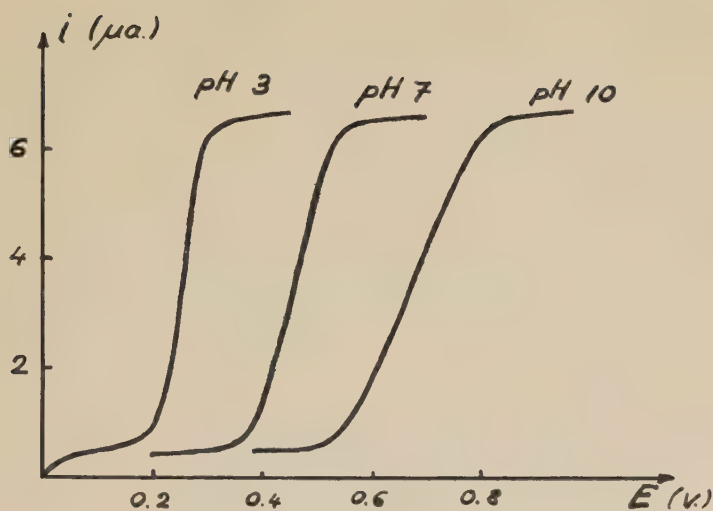
La réduction des groupes nitro est non seulement fonction du pH, mais encore de la nature des tampons utilisés et des ions présents dans la solution. L'adjonction d'alcool influe également sur le mode de réduction.

Nous avons reproduit dans les graphiques 9 et 10 les courbes obtenues pour la phénylalanine nitrée par HNO_3 10 N et $\text{H}_2\text{SO}_4\text{-KNO}_3$ à divers pH. Les polarogrammes des acides mononitrobenzoïque et nitrophénylacétique, en travaillant dans des conditions identiques, sont analogues à ceux obtenus pour la phénylalanine nitrée par HNO_3 10 N. Les acides dinitrobenzoïques présentent un saut en milieu acide et deux en milieu neutre et alcalin. La phénylalanine nitrée par $\text{H}_2\text{SO}_4\text{-KNO}_3$ fournit des sauts analogues en milieu acide et neutre, mais présente trois vagues en milieu alcalin.

Dans nos conditions de travail, solutions tamponnées et contenant une quantité relativement importante de nitrate de potassium, nous n'avons pas observé de réduction allant jusqu'au stade amine. Tous les dérivés nitrés examinés, de pH 3 à pH 11, se réduisent en hydroxylamines, avec 4 e pour les mononitro et 8 e pour les dinitro.

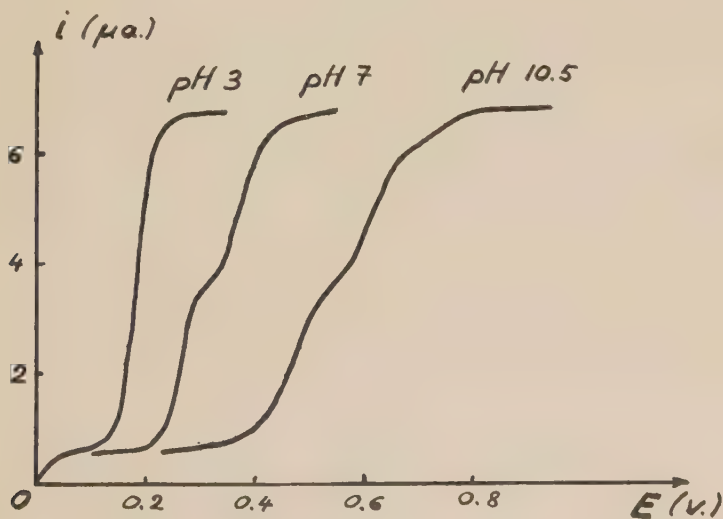
Sélectivité

Dans les conditions des deux méthodes de dosage de la phénylalanine, la tyrosine et le tryptophane sont nitrés et produisent des sauts polarographiques. L'histidine ne fournit pas de composé réductible. Nous avons essayé d'éliminer par oxydation ces deux composés gênant le dosage, soit avant la nitration, soit après.



GRAPHIQUE 8

Courbes obtenues avec la phénylalanine nitrée par HNO_3 10 n
 $C = 0,5 \cdot 10^{-3}$ mol.



GRAPHIQUE 9

Courbes obtenues avec la phénylalanine nitrée par $\text{H}_2\text{SO}_4\text{-KNO}_3$
 $C = 0,25 \cdot 10^{-3}$ mol.

Les meilleurs résultats ont été obtenus en employant un excès de permanganate de potassium après la nitration puis en éliminant cet excès par de l'eau oxygénée. Dans nos conditions polarographiques, le manganèse introduit dans la solution ne gêne pas.

Nous sommes parvenus ainsi à éliminer entièrement le saut polarographique dû à la tyrosine. Le tryptophane est également touché, mais sans être totalement éliminé. Son saut est réduit d'environ 70% par cette oxydation. La phénylalanine est également oxydée, mais son saut ne subit pas de modifications; comme nous le vérifierons par la suite, ceci s'explique de la manière suivante: la nitrophénylalanine est oxydée sur la chaîne latérale et fournit de l'acide p-nitrobenzoïque. Nous avons vu que ces deux corps ont un potentiel de réduction très voisin et qu'à même concentration moléculaire, leurs sauts sont identiques. Donc si nous transformons en partie ou totalement la nitrophénylalanine en acide nitrobenzoïque, la concentration en mole ne change pas et la hauteur du saut reste constante.

Nous pouvons doser la phénylalanine en présence de tyrosine (jusqu'à 10 fois plus de tyrosine) en opérant de la manière suivante: la nitration s'effectue normalement selon la méthode décrite. Dans le mélange dilué et porté à 60°, on ajoute quelques cristaux de permanganate, jusqu'à coloration violette persistante. La solution est alors décolorée par une ou deux gouttes d'eau oxygénée, puis tamponnée et diluée comme dans la méthode normale. La polarographie s'effectue comme précédemment.

CHAPITRE VIII

ÉTUDE CHROMATOGRAPHIQUE DES PRODUITS DE NITRATION DE LA PHÉNYLALANINE

Nous nous sommes efforcés de mettre en évidence le fait que la réaction de nitration selon les deux méthodes employées pour le dosage de la phénylalanine est quantitative, puis nous avons identifié les produits obtenus.

La phénylalanine est susceptible de fournir des dérivés mono-, di- ou trinitrés; il peut en outre se former des produits de dégradation par oxydation de la chaîne latérale, soit avant soit après la nitration sur le noyau. Nous étudierons donc un moyen d'identification des divers composés, en particulier les acides nitro-, dinitro-, trinitrobenzoïques et nitrophénylacétiques.

On trouve très peu de renseignements dans la littérature sur la chromatographie des dérivés nitrés; aussi avons-nous commencé par la mise au point d'une méthode de séparation des composés cités ci-dessus.

I. Techniques

Nous avons employé la technique de chromatographie sur papier, selon la méthode ascendante.

Une feuille de papier filtre plonge par un des bords dans un solvant qui la parcourt par capillarité. Auparavant, parallèlement au bord qui plongera dans le solvant, on a tracé une ligne qui restera à l'extérieur du liquide, la ligne de départ du chromatogramme. Sur cette ligne, à des écartements de 2 à 3 cm, on dépose avec une micropipette un volume connu, 0,005 à 0,01 cc,

des solutions à chromatographier, de concentration convenable. Ceci constitue les taches initiales. La feuille est ensuite plongée dans le solvant qui la parcourt dans le sens perpendiculaire à la ligne de départ. C'est le développement du chromatogramme, qui doit être réalisé dans une enceinte parfaitement close. La cellulose avec l'eau incluse constitue la phase fixe et le solvant ascendant la phase mobile.

La composition des phases fixes et mobiles doit rester constante au cours du développement du chromatogramme. Pour cela, il est indispensable que le solvant en parcourant la feuille ne s'appauvrisse pas en eau ou en substances fixées par la cellulose. A cette fin, la feuille de papier, avant d'être plongée dans le solvant doit être équilibrée dans une enceinte close avec les vapeurs des constituants du solvant durant 24 heures.

Pour un papier donné, un solvant donné à une température donnée, le déplacement est caractéristique de la substance étudiée. Pour le caractériser, on définit la valeur :

$$R_f = \frac{\text{distance du déplacement de la substance}}{\text{distance du déplacement du front du solvant}}$$

En respectant les conditions énumérées ci-dessus, les valeurs caractéristiques R_f sont parfaitement reproductibles.

Installations

Nous utilisons un grand bocal de verre dont la partie supérieure rodée peut être fermée hermétiquement par une plaque de verre. Sur le fond plat, nous disposons un petit cristalliseur pouvant contenir environ 80 cc de solvant.

Le papier filtre, de forme carrée de 30 cm de côté, est agrafé sous forme de rouleau et dressé dans le cristalliseur à l'intérieur du bocal. Ce dispositif permet d'équilibrer le papier en introduisant du solvant au fond du bocal, le rouleau reposant sur le cristalliseur vide. Après 24 heures, on introduit à l'aide d'une pipette du solvant frais dans le cristalliseur pour le développement du chromatogramme.

Papier

Nous avons employé du papier pour chromatographie de vitesse moyenne, de Schleicher et Schull n° 2043 b.

Nous avons procédé à un certain nombre d'essais avec du papier tamponné. La feuille est préalablement immergée dans un mélange à parties égales de phosphate mono et disodique 0,1 molaire puis égouttée et séchée à la température du laboratoire.

Préparation des solutions

Les dérivés nitrés, à l'état pur et cristallisés, sont dissous dans l'alcool à une concentration uniforme de 1 g/l.

Les mélanges de nitration, 10 mg de phénylalanine nitrée par 1 ml. de H_2SO_4 et 0,2 g de KNO_3 , sont simplement dilués à 10 ml. avec de l'eau distillée. Les résultats obtenus sont analogues avec ou sans neutralisation du mélange à chromatographier. Le mélange est porté directement sur le papier, sans le neutraliser. Nous avons renoncé par ailleurs, à éliminer, soit par extraction soit par électrolyse, les ions inorganiques qui ne nous gênent pas dans nos conditions de travail, ceci pour éviter une perte ou une modification des constituants.

Solvants

Après une série d'essais, nous avons constaté que les solvants miscibles à l'eau donnaient les meilleurs résultats, tant au point de vue séparation que netteté des spots. La phase butanol saturé d'eau, en milieu acide ou alcalin produit de longues trainées, de même que les phases à base de phénol, de pyridine, de collidine. Ceci provient d'une dissolution insuffisante des corps à séparer par ces solvants. Les mélanges contenant de la formamide, diméthylformamide, éthylène glycol entraînent les dérivés nitrés trop facilement et les spots sont déplacés sur le front même du solvant.

Nous avons conservé finalement deux mélanges de solvants qui ont l'avantage de donner des résultats nets et reproductibles en présence de sels inorganiques Ce sont:

isopropanol - acétone - eau - acide acétique
éthanol - eau - ammoniac

Révélateurs

Les divers dérivés nitrés étudiés étant faiblement colorés, il est nécessaire de les révéler sur les chromatogrammes.

Après séchage de la feuille, on pulvérise une solution de chlorure stanneux à 1 % dans de l'acide chlorhydrique 0,5 N. On sèche sous infra-rouge puis pulvérise une solution de p-diméthylaminobenzaldéhyde à 1 % dans un mélange alcool-HCl 0,5 n (1:1). Les dérivés nitrés donnent des spots de couleur jaune à orangé. Ce réactif permet de déceler jusqu'à 0,05 γ de di- et trinitro et 0,1 γ de mononitro.

Nous avons également utilisé la ninhydrine pulvérisée en solution à 0,3 % dans le butanol pour révéler la phénylalanine: Après chauffage à l'étuve à une température de 90° durant 5 minutes, des spots de la phénylalanine se colorent en violet. Nous avons constaté que la phénylalanine nitrée produit également une coloration violette avec ce réactif; elle peut donc être révélée par son groupe nitro ou amino-acide. Les deux méthodes peuvent être utilisées successivement sur le même chromatogramme. Il faut alors commencer par révéler les acides aminés au moyen de la ninhydrine et noter l'emplacement des spots. Quand on pulvérise la solution de chlorure stanneux, les spots violets s'effacent. Ceux des mono et dinitrophénylalanine réapparaissent en jaune après pulvérisation de la p-diméthylaminobenzaldéhyde.

II. Partie expérimentale

Nous plaçons sur la ligne de départ du papier, tous les 2,5 cm, 30 γ de chaque substance. Pour les mélanges obtenus après nitration, nous portons une quantité équivalente à 30 γ de phénylalanine. Les nitrations ont été effectuées dans les conditions indiquées pour les dosages, par HNO_3 10 n et $\text{H}_2\text{SO}_4\text{-KNO}_3$. Nous avons également chromatographié les mélanges de nitration oxydés par quelques cristaux de permanganate de potassium et décolorés par 1-2 gouttes d'eau oxygénée.

Les valeurs caractéristiques obtenues dans différents solvants sont données dans le tableau ci-dessous.

	R _f				
	I	II		III	
		a	b	a	b
acide o-nitrobenzoïque	0,88	0,96	0,69	0,73	0,78
acide m-nitrobenzoïque	0,96	0,97	0,97	0,77	0,79
acide p-nitrobenzoïque	0,97	0,97	0,97	0,75	0,78
acide p-nitrophénylacétique	0,98	0,99	1	0,73	0,75
acide 2-4-dinitrobenzoïque	0,99	0,99	1	0,69	0,69
acide 3,5-dinitrobenzoïque	0,84	0,94	0,96	0,75	0,76
acide 2,4,6-trinitrobenzoïque	0,99	0,99	1	0,85	0,85
phénylalanine	0,33	0,68	0,68	0,64	0,71
phénylalanine nitrée	}	0,34	0,80	0,75	0,54
par HNO ₃ 10n		0,90	0,97	0,96	0,72
		0,98	0,99	1	0,85
phénylalanine nitrée	}	0,38	0,72	0,72	0,55
par H ₂ SO ₄ -KNO ₃		0,73	0,83	0,95	0,69
		0,85	0,95	1	0,75
		0,99	0,99		0,85
phénylalanine nitrée	}				0,73
par HNO ₃ 10n et oxydée					0,75
phénylalanine nitrée	}				0,69
par H ₂ SO ₄ -KNO ₃ et oxydée					0,75

I : isopropanol 30 : acétone 15 : eau 6 : CH₃COOH glac. 6

II a : même système dans la proportion 30 : 15 : 18 : 9, papier normal

II b : idem, avec papier tamponné

III a : éthanol 80 : ammoniaque conc 5 : eau 15

III b : idem, avec papier tamponné

III. Interprétation des résultats

Il n'est pas aisé de différencier les acides nitrobenzoïques. Il faut pour cela, tenir compte des résultats obtenus à l'aide des mélanges de solvants I, IIb et IIIa. Les résultats fournis par les acides benzoïques manquent de netteté; les R_f sont très voisins quels que soient les éluants employés. La nitrophénylalanine par contre est facilement identifiable, ayant un R_f beaucoup plus faible que les autres dérivés nitrés. Ce fait tient probablement

à la présence de la chaîne latérale. Celle-ci augmente la solubilité de ce corps dans l'eau et d'autre part en augmente le poids moléculaire.

La phénylalanine nitrée par HNO_3 10 N donne une tache principale, révélée en violet par la ninhydrine et en jaune par la p-diméthylaminobenzaldéhyde (DAB), que nous admettons être de la nitrophénylalanine. Nous trouvons également un second spot double correspondant à de l'acide o- et p-nitrobenzoïque. Sur une prise équivalent à 30 γ de phénylalanine, ce double spot peut être évalué à 0,6 γ soit 2 % d'un mélange d'acides nitrobenzoïques. On ne décèle pas de phénylalanine. on peut donc admettre que cette méthode de nitration fournit approximativement 98 % de nitrophénylalanine et 2 % d'acides o- et p- nitrobenzoïques. On remarque en outre une trace d'acide trinitrobenzoïque.

Dans ce même mélange, après oxydation par le permanganate, on ne trouve plus de nitrophénylalanine. Elle est oxydée quantitativement en un mélange d'acides o et p-nitrobenzoïques.

La nitration par $\text{H}_2\text{SO}_4\text{-KNO}_3$ fournit un mélange plus complexe. Le spot principal, révélé par la ninhydrine en violet et en jaune orangé par le réactif des dérivés nitrés, correspond vraisemblablement à de la 2,4-dinitrophénylalanine, tandis que deux autres spots correspondent aux acides 2,4- et 3,5- dinitrobenzoïques. On décèle également une trace d'acide trinitrobenzoïque. On constate enfin l'absence totale de phénylalanine non nitrée. On peut évaluer que par cette méthode on obtient environ 60 % de dinitrophénylalanine, 30 % d'acide 2,4 dinitrobenzoïque et 10 % d'acide 3,5- dinitrobenzoïque.

Après oxydation par le permanganate, ce mélange ne contient plus de dinitrophénylalanine, mais en gros 90 % d'acide 2,4 dinitrobenzoïque et 10 % d'acide 3,5- dinitrobenzoïque. Ceci nous permet de dire que la phénylalanine est nitrée en position 2 et 4.

CONCLUSIONS

Nous avons étudié les conditions de nitration de la phénylalanine en fonction du temps et de la concentration en acides. Nous avons établi deux méthodes de dosage polarographique de la phénylalanine après nitration par de l'acide nitrique 10 N et par un mélange acide sulfurique concentré nitrate de potassium. Nous parvenons à doser jusqu'à 30 γ de phénylalanine avec une précision de 12 %; en opérant avec des concentrations comprises entre 10^{-4} et 10^{-3} molaire, on atteint une précision de 2 %.

Nous avons étudié parallèlement quelques acides benzoïques nitrés, corps très voisins que l'on trouve comme produits de dégradation de la nitrophénylalanine. Les potentiels de réduction de ces dérivés nitrés sont très proches et ne permettent pas de les différencier dans un mélange. Leurs sauts polarographiques s'ajoutent; tout au plus remarque-t-on de légères inflexions dans la courbe.

Par chromatographie sur papier, nous avons déterminé que la nitration de la phénylalanine au moyen d'acide nitrique 10 N fournit 98 % de nitrophénylalanine plus 2 % d'acide o- et p-nitrobenzoïques. Avec la seconde méthode de nitration, plus énergique, on obtient un mélange de 60 % de 2,4 dinitrophénylalanine, 30 % d'acide 2,4 dinitrobenzoïque et 10 % d'acide 3,5 dinitrobenzoïque.

Bien que la nitration de la phénylalanine donne un mélange de dérivés nitrés, le dosage polarographique reste possible car tous les corps formés ont sensiblement le même $E_{1/2}$, et en tant que dérivés mononitrés (avec HNO_3 10 N) et dinitrés (avec le mélange $\text{KNO}_3\text{-H}_2\text{SO}_4$), mettent en jeu le même nombre d'électrons.

INDEX BIBLIOGRAPHIQUE

1. *Schulze, Kollmann*: Biochem. Z. **252** 185 (1885)
 2. *Brazier*: Biochem. J. **24** 1188 (1930)
 3. *Martin, Syngé*: id. **35** 1358 (1941) et **37** 79 (1943)
 4. *Kappeler, Adler*: Biochem. Z. **252** 185 (1932)
 5. *Block, Bolling*: J. Biol. Chem. **129** 1 (1939)
 6. *Hess, Sullivan*: Arch. Bioch. **5** 165 (1944)
 7. *Monnier, Rusconi*: Helv. Chim. Acta **34** 1297 (1951)
 8. *Monnier, Besso*: Anal. Chim. Acta **7** 286 (1952)
 9. *Faraggi*: Thèse n° 1234, Université de Genève
 10. *Dennis, Powell*: J. Am. Chem. Soc. **71** 1484 (1949)
 11. *Page, Smith*: J. Phys. Coll. Chem. **53** 553 (1949)
 12. *Smith, Waller*: Trans. Farad. Soc. **46** 290 (1950)
 13. *Pearson*: Trans. Farad. Soc. **44** 683 (1948)
 14. *Pearson*: Trans. Farad. Soc. **45** 199 (1950)
 15. *Hollek, Exner*: Zeit. für Elektrochemie **56** 677 (1952)
-

TABLE DES MATIÈRES

Introduction	5
Chapitre premier : <i>Conditions de nitration de la phénylalanine</i>	7
1. Concentration de l'acide nitrique	7
2. Durée de nitration	10
Chapitre II : <i>Conditions de polarographie de la phénylalanine nitrée</i>	12
Etude en fonction du pH	12
Chapitre III : <i>Etude des résultats polarographiques de la phénylalanine nitrée par HNO_3 10 N</i>	15
I. Etude logarithmique des polarogrammes	15
II. Etude des potentiels $E_{1/2}$ en fonction du pH	16
III. Calcul du nombre d'électrons « n »	17
Chapitre IV : <i>Dosage polarographique de la phénylalanine nitrée</i>	18
Chapitre V : <i>Etude comparative de dérivés voisins mononitrés</i>	22
Méthode de dosage par étalon interne	24
Chapitre VI : <i>Etude polarographique de la phénylalanine nitrée par $\text{H}_2\text{SO}_4\text{-KNO}_3$</i>	26
Courbe d'étalonnage	27
Chapitre VII : <i>Etude comparative de dérivés voisins dinitrés</i>	28
Réduction des dérivés nitrés au polarographe	31
Sélectivité	32
	43

Chapitre VIII : <i>Etude chromatographique des produits de nitration de la phénylalanine</i>	35
I. Technique	35
II. Partie expérimentale	38
III. Interprétation des résultats	39
Conclusions	41
Index bibliographique	42

